

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/PTO 22 MAR 2005

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 08 DEC 2003
WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 44 842.6

Anmeldetag: 22. September 2002

Anmelder/Inhaber: Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven/DE

Bezeichnung: Für proteinspaltende Enzyme in Form von spezifischen Proteasen kodierende Nukleinsäuresequenzen, zugehörige Polypeptide und Verwendung von allen

IPC: C 12 N 15/57

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

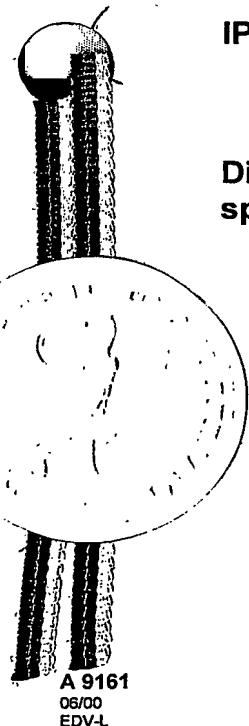
München, den 13. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Faust

BEST AVAILABLE COPY



Für proteinabbauende Enzyme in Form von spezifischen Proteasen kodierende Nukleinsäuresequenzen, zugehörige Polypeptide und Verwendung von allen.

5 Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf für proteinspaltende Enzyme in Form von speziellen Proteasen kodierende Nukleinsäuresequenzen, auf die zugehörigen Polypeptide und auf Verwendungen sowohl der Nukleinsäuresequenzen selbst als auch der zugehörigen Polypeptide.

Proteasen (auch: Proteininasen) sind eiweißspaltende Enzyme („proteolytische Hydrolasen“) die nach ihren Wirkungsmechanismen unterschieden werden. Eiweiße sind typisch gefaltete Polypeptidketten. Die Proteasen werden daher auch als Peptidasen bezeichnet und in Endo- und Exopeptidasen unterschieden. Endopeptidasen spalten die Peptidketten im Inneren auf und erzeugen so kleinere Teilstücke, Exopeptidasen können die endständigen Aminosäuren abspalten. Proteolytisch wirkende Enzyme sind in biologischen Organismen allgegenwärtig und erfüllen typspezifische Zwecke. Sie können daher einerseits funktionsbezogen zu Therapiezwecken eingesetzt werden oder technischen Reinigungszwecken gegen proteinhaltige Verschmutzungen dienen. Die Familien der Calpain-Proteasen (CANP) und Metalloproteasen (MP) sind wichtige Vertreter der Proteasen und Gegenstand intensiver Forschungen.

25

Calpain-7-Protease:

Bisher sind ca. 15 verschiedene CANP bekannt. Die am weitesten erforschten CAPN bestehen aus einer großen 80kDa (kilo Dalton) - und einer kleinen 30kDa - Untereinheit. Die große Untereinheit besteht ihrerseits aus vier und die kleine Untereinheit aus zwei funktionalen Domänen. Die Domäne IV der großen und die Domäne VI der kleinen Untereinheit sind regelmäßig über ihre Faltungsformen („EF-hands“) als calziumbindende Domäne ausgeprägt. Es

wird vermutet, dass die proteolytische Aktivität dieser CAPN erst durch die gebundenen Calciumatome ausgelöst wird. Die neueren CAPN (5,6,7,10,13; vergleiche z.B. Veröffentlichung I) verfügen dagegen in der Domäne IV der großen Untereinheit über keine solchen, calziumbindenden Strukturen.

5 Grundsätzlich sind alle Mitglieder der CAPN-Familie gewebsspezifisch ausgebildet und erfüllen so die unterschiedlichsten Aufgaben.

CAPN nehmen oft Schlüsselstellungen in Stoffwechselwegen ein und sind am Verlauf von Krankheiten beteiligt. Z.B. sind die CAPN 1 und 2 Komponenten der Reaktionskaskade der Apoptose („programmierter Zelltod“) und damit am Verlauf der Alzheimer-Krankheit beteiligt. Auch auf Krebserkrankungen können CAPN Einfluss nehmen. Dabei werden z.B. Brust- und Darmkrebs durch die Erhöhung der zellulären Konzentration des p53-Markerproteins ausgelöst. Der Konzentrationsanstieg wird durch die Inhibierung von beteiligten CAPN erreicht,

10 die die p53-Konzentration in gesunden Zellen normalerweise sehr gering halten (vergleiche Veröffentlichung I: „The calpain family and human disease“, Yuanhui Huang und Kevin K.W. Wang in Trends in Molecular Medicine Vol.7 No.8 August 2001, pp 355-362).

15 Calpaine spielen eine besondere Rolle bei der Zell-Migration in der extrazellulären Matrix. Zellen wandern, indem sie sich am hinteren Ende auflösen und am vorderen Ende aufgebaut werden. Calpaine sind dabei durch proteolytische Spaltung von Proteinkomplexen des Stützapparats am Ende der Zelle an dieser Wanderungsbewegung beteiligt (vergleiche Veröffentlichung II: „V-SRC's hold over actin and cell adhesions“, Frame, Fincham, Carragher, Eyke in Nature Reviews, Molecular Cell Biology, Vol.3, April 2002, pp 233-245).

20 Die beschriebenen Erkenntnisse wurden durch Untersuchungen an Wirbellosen, Säugetieren und dem Menschen gewonnen. CAPN in Pflanzen und Pilzen sind bisher nur durch Genom- und EST-Projekte identifiziert worden. Bei Pflanzen wird eine Wirkung in der Pathogenabwehr, bei Pilzen bei der

Anpassung an alkalische Lebensbedingungen vermutet. Bei der gesamten Klasse der Kieselalgen sind CAPN bisher nicht bekannt.

Enzyme aus der Familie der Calpaine (jedoch nicht Calpain-7) werden in der
5 Patentliteratur z.B. in **EP1214427**, **CA2321270** und **DE10031932** offenbart. In Bezug auf die vorliegende Erfindung handelt es sich bei diesen Veröffentlichungen um technisch-wissenschaftlichen Hintergrund.

Zink-Metalloprotease:

10 Metalloproteasen (MP) sind unter anderem regelmäßig in den Mitgliedern der sogenannten ADAM-Familie (a disintegrin and metalloprotease) der Transmembran-Proteine enthalten, die aus einer Desintegrin- und einer MP-Domäne bestehen und Zelladhäsions- und Proteaseaktivität im Zusammenhang mit Vorgängen bei der Befruchtung, der Entstehung von
15 Nervengewebe und bei Entzündungsreaktionen entfalten (vergleiche **Veröffentlichung III**: „Autotrope Signaltransduktion durch membranständigen Tumor-Nekrose-Faktor TNF“, Doktorarbeit Uni Stuttgart, E.Haas, 1999, pp 6-8).

20 Ferner spielen Metalloproteasen eine wichtige Rolle im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAS). Die Aspartyl-Protease Renin spaltet Angiotensinogen in Angiotensin I. Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), das anschließend Angiotensin I in Angiotensin II spaltet, ist eine Zink-Metalloprotease (ZnMP). Angiotensin II hat eine gefäßverengende und damit Blutdruck steigernde Wirkung und fördert die Freisetzung von Aldosteron in der Nebennierenrinde woraus letztlich Hypertrophie am Herzen folgt. ACE ist also ein wichtiger Stoff zur Regulierung der Kreislauffunktionen und muss bei bestimmten Herz-Kreislauferkrankungen unterdrückt werden (ACE-Inhibitor)
25 (vergleiche **Veröffentlichung IV**: Cardiovascular Physiology Concepts, University of Ohio, R.E.Klabunde,v.04.06.2002 aus <http://www.ucom.ohiou.edu/CVPhysiology/BP015.htm> (Stand 20.08.2002)).
30

Weiterhin sind Metalloproteasen als Collagenasen am Abbau von Stützgewebe im Körper beteiligt. Collagene sind Gerüsteiweißkörper und bilden als gegen enzymatische Angriffe schützender Hauptbestandteil interzellulärer Stützsubstanz 25% des Körpergewebes. Durch Einlagerung mineralischer
5 Kristalle können Collagene zu harten Knochen- und Zahnsubstanzen werden. Im Collagen-Lebenszyklus dienen Collagenasen zur Verarbeitung nicht mehr benötigter Collagenanteile. Collagenasen spielen eine Rolle bei der Chemonukleolyse, einer Behandlungsmethode bei Bandscheibenschäden durch Auflösung des Bandscheibenkerns (nucleus pulposus).

10

Enzyme aus der Familie der Metalloproteasen werden in der Patentliteratur z.B. in **WO9964610** (Zink-Metalloprotease), **US2002068055** (Metallo-Endopeptidase) und **US5750391** (Metallo-Endopeptidase) offenbart. In Bezug auf die vorliegende Erfindung handelt es sich bei diesen Veröffentlichungen
15 auch um technisch-wissenschaftlichen Hintergrund.

20

Aus der **Veröffentlichung V „Zahllose Geheimnisse der Natur“** von K. Eske (vgl. BioLOG, 3.Ausgabe, Februar 2000, pp 2/3, abrufbar unter <http://www.bioregio.org/BioLOG-3.pdf>, - Groß-/Kleinschreibung bei Seitenaufruf im Internet beachten! - Stand 01.09.2002) ist es bekannt, kälteangepasste Enzyme aus Bakterien, die in Tiefseeregionen vorkommen, zu isolieren. Neben dem Vorteil, dass kälteangepasste Enzyme zur Expression keine erhöhten Temperaturen benötigen, ergibt sich bei den entsprechenden Organismen aus den Tiefseeregionen ein großes Vorkommenspotential, da 80% des die
25 Erdoberfläche bedeckenden Wassers eine Temperatur unter 5 °C aufweist. Die Temperatur des Aktivitätsmaximums dieser Organismen und ihrer funktionellen Bestandteile liegt deutlich unter dem anderer Organismen aus temperierten und tropischen Breiten. Durch den Einsatz von kälteangepassten Mikroorganismen, auch in gentechnisch modifizierter Form, ist damit eine
30 Produktion unter niedrigen Temperaturen mit einem gegenüber den herkömmlichen Gewinnungsverfahren mit nicht kälteangepassten Organismen

deutlich geringerem Energieeinsatz entscheidend wirtschaftlicher als bei deren sonst üblichen Aktivitätstemperaturen.

Vor dem Hintergrund dieser bedeutenden Erkenntnisse ist es daher die
5 Aufgabe für die vorliegende Erfindung, zur wirtschaftlichen Produktion der erfindungsgemäßen Proteasen einen kälteangepassten Organismus zu finden, der Nukleinsäuresequenzen aufweist, die für kälteangepasste Enzyme in Form von spezifischen Proteasen bei niedrigen Prozesstemperaturen (um 0°C) kodieren. Die erfindungsgemäße Lösung hierfür ist dem Anspruch 1 zu
10 entnehmen. Es werden zwei verschiedene Nukleinsäuresequenzen aus der kälteangepassten Diatomee *Fragilaropsis cylindrus* beansprucht, von denen die eine für eine Calpain-7-Protease und die andere für eine Zink-Metalloprotease kodiert. Vorteilhafte Weiterbildungen und Anwendungen, die sich auch auf die zu den beanspruchten Nukleinsäuresequenzen zugehörigen
15 Polypeptide beziehen, sind den unter- und nebengeordneten Ansprüchen zu entnehmen.

Mit der erfindungsgemäßen Lösung werden die an die Erfindung gestellten Anforderungen optimal erfüllt. Zum einen weist der die beanspruchten
20 Nukleinsäuresequenzen aufweisende Organismus spezifische Proteasen in Form sowohl eines Calpain-7-Protease-Enzyms als auch eines Zink-Metalloprotease-Enzyms auf, zum anderen entstammt der Organismus der antarktischen See, sodass diese Enzyme zusätzlich kälteangepasst sind und zu ihrer Aktivität keine Wärmezufuhr benötigt wird. Die Kenntnis solcher, die
25 beanspruchten Nukleinsäuresequenzen enthaltenden Gene ist von elementarer Wichtigkeit, wenn es z.B. um die Bereitstellung großer Mengen solcher Nukleinsäuresequenzen bei geringem Energieaufwand geht. Die mikrobielle Synthese dieser Stoffe erzielt mit der speziellen, schnell wachsenden kälteangepassten Kieselalge *Fragilaropsis cylindrus* unter niedrigen
30 Temperaturen hohe Erträge.

Durchgeführte Sequenzanalysen bestätigen, dass die erfindungsgemäß beanspruchten Nukleinsäuresequenzen für eine Calpain-7-Protease bzw. eine Zink-Metalloprotease kodieren. Durch die heutigen, entwickelten Methoden der automatisierten Sequenzierung von Nukleinsäureabschnitten ist es möglich
5 geworden, in überschaubaren Zeiträumen gezielt Gene mit gewünschten Eigenschaften aus aussichtsreichen Organismen zu isolieren. Umfangreiche öffentliche Datenbanken mit bereits bestimmten, bekannten Funktionen zugeordneten Sequenzen dienen der schnelleren Verifizierung der Ergebnisse der mühsamen Suche. Zur Bereitstellung des für die Sequenzierung aufbereiteten Grundmaterials aus der speziellen Kieselalge dient eine Reihe
10 von an sich bekannten Arbeitsschritten:

1) Isolation und Kultivierung des Organismus *Fragilariaopsis cylindrus*

15 **Isolation** : Während einer Antarktisfahrt mit dem deutschen Forschungseisbrecher „Polarstern“ in die Weddell-See wurde die Kieselalge *Fragilariaopsis cylindrus* aus dem Meereis isoliert. Die Artbestimmung erfolgte in einfacher Weise durch die Typisierung der Struktur der Schale (vergleiche
Veröffentlichung VI von Medlin & Priddle : „Polar marine diatoms“, 2nd edition,
20 British Antarctic Survey, Cambridge 1990, pp 182, 192).

Kultivierung : Die Kieselalge wurde bei 0°C in einem nährsalzangereicherten Medium 2 x f/2 bei 10µmol Photonen m⁻²s⁻¹ mit 24h Licht, gehältert (vergleiche:
Veröffentlichung VII von Guillard & Ryther : “Studies of marine plancton
diatoms, I.Cyclotella nana (Husted) and Detonula confervacea (Cleve)”, 1962,
Can.J.Microbiol. 8, pp 229:239). Für eine gesteigerte Expression der für die Kälteanpassung der Art verantwortlichen Gene wurden die Algen in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase auf -2°C abgekühlt. Dies entspricht dem Gefrierpunkt von Meerwasser. Nach 5 Tagen wurden die Boten-RNA (mRNA, messenger RNA) aus den Algen isoliert. Die mRNA repräsentieren alle gerade
30

aktiven Gene, also auch diejenigen, die für die Kälteanpassung verantwortlich sind.

2) Isolation der mRNA

5

Die gesamte RNA wurde mit dem RNAeasy Plant Mini Kit (Firma Qiagen) isoliert. Aus ca. 100 µg RNA konnte mit Hilfe des Oligotex mRNA Midi Kit (Firma Qiagen) ca. 800 ng RNA für die cDNA-Synthese isoliert werden.

10

3) Herstellung und Screening einer cDNA-Bank

Die cDNA-Bank wurde auf der Basis der mRNA mit dem SMART cDNA-Library Construction Kit (Firma Clontech) hergestellt:

15

- A) Von der mRNA wurde dazu mit Hilfe von Oligonukleotiden und CDS III/3' Primern der erste cDNA-Strang synthetisiert.
- B) Anschließend wurde die Doppelstrangsynthese mit Hilfe der LD-PCR (long distance polymerase chain reaction) im Eppendorf-Thermocycler unter folgendem Programm realisiert:
- C)
 - 1. 5 min Denaturierung bei 95°C, anschließend 20 Zyklen von 6 min bei 68°C und 2 min bei 95°C.
 - 2. Nach einem S_FI-Verdau (mit Restriktionsenzym aus *Streptomyces fimbriatus*) der cDNA wurde sie in CHROMA Spin-400 Säulen der Größe nach fraktioniert, so dass nur cDNAs der Länge >400bp (Basenpaare) für die Klonierung zum Einsatz kamen.
 - 3. Diese cDNAs wurden über Nacht bei 16°C in Triplex2 Vektoren ligiert, die von λ-Phagen aufgenommen werden konnten. Der Titer dieser cDNA-Bank lag bei 2.7×10^9 pfu/ml (plaque forming units / ml).

25

30

4. Ein Blau-Weiß-Screening mit IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid) und X-Gal (X-Galactosid) zeigte eine Rekombinationseffizienz von 70%.

4) Sequenzanalyse

5

Positive Phagen-Plaques wurden vom 5'-Ende mit λ-Primern vom Qiagen-Sequencing-Service sequenziert. Die Sequenzen wurden in der Genbank bei NCBI (National Center for Biotechnology Information) mit der BLASTX-Option auf ihre Homologien zu vorhandenen Sequenzen untersucht (BLAST-Protokoll vom 14.12.2001, Calpain-7-Protease; BLAST-Protokoll vom 24.04.2002, Zink-Metalloprotease). Für die Calpain-7-Protease konnte aus ca. 400 Sequenzen eine homologe Sequenz, für die Zink-Metalloprotease mindestens eine homologe Sequenz gefunden werden.

10

15

20

In **Figur 1** ist das Ergebnis einer phylogenetischen Analyse für die Calpain-7-Protease aus der Diatomee *Fragilaropsis cylindrus* dargestellt. Sie gruppiert mit signifikantem bootstrap support (allgemein bekannte mathematisch-statistische Methode) von 99% mit anderen Calpain-7-Proteasen. In **Figur 2** ist das Ergebnis einer phylogenetischen Analyse für die Zink-Metalloprotease aus *Fragilaropsis cylindrus* dargestellt. Sie gruppiert mit signifikantem bootstrap support von 99% mit anderen Zink-Metalloproteasen.

Es handelt sich daher bei den kälteangepassten Enzymen, die von den beanspruchten Nukleinsäuresequenzen nach der Erfindung aus der Diatomee *Fragilaropsis cylindrus* kodiert werden, mit einer Sicherheit von 99% ebenfalls um eine Calpain-7-Protease bzw. um eine Zink-Metalloprotease.

25

Sequenzprotokoll

<110>Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,
Bremerhaven

5 <120>Für eine Calpain-Protease kodierende neue Nukleinsäuresequenz aus
einer kälteangepassten marinen Diatomee *Fragilariaopsis cylindrus*

10 <130>AWI 01/0902 DE

<160>2

<210>1

<211>544

15 <212>DNA

<213>*Fragilariaopsis cylindrus*

<400>1

20 GG GAA TTC GGC CTT ACG GCC GGG GAT GAT GGA ATG TTC TGG ATT AGT 47
Glu Phe Gly Leu Thr Ala Gly Asp Asp Gly Met Phe Trp Ile Ser
1 5 10 15

25 TGG GAG GAT GTC TTG CTT TAT TTC CGC AAT TTA CAA TTA TCA TGG AAT 95
Trp Glu Asp Val Leu Leu Tyr Phe Arg Asn Leu Gln Leu Ser Trp Asn
20 25 30

30 CCC AAA CTA TTT GCG TAT CGG ATG ACT ACT CAT GGC TTA TGG CCA AAG 143
Pro Lys Leu Phe Ala Tyr Arg Met Thr Thr His Gly Leu Trp Pro Lys
35 40 45

35 GAT CAG GGA CCA CAA AAT GAT GCA TTT AAT GTC GGA GAG AAT CCA CAA 191
Asp Gln Gly Pro Gln Asn Asp Ala Phe Asn Val Gly Glu Asn Pro Gln
50 55 60

40 TAT ATC ATG TCT TTC TCC GAA AAA GCT GTA TCG AGT AAA CCA ACG ATT 239
Tyr Ile Met Ser Phe Ser Glu Lys Ala Val Ser Ser Lys Pro Thr Ile
65 70 75

45 TGG GTA CTG ATA TCA AGG CAT GTA AGC AAA CAG GAG CAA GAA GGT GCT 287
Trp Val Leu Ile Ser Arg His Val Ser Lys Gln Glu Gln Glu Gly Ala
80 85 90 95

50 GAG GTG AAT GAT TTC TTA ACC ATA CAT CTC GTT AGA AAC TCG GCT ACA 335
Glu Val Asn Asp Phe Leu Thr Ile His Leu Val Arg Asn Ser Ala Thr
100 105 110

55 TTA GAA AGA GTT TGG TAT CCC CAT GGA AAA GCA ACG ATT GCT AAT GGA 383
Leu Glu Arg Val Trp Tyr Pro His Gly Lys Ala Thr Ile Ala Asn Gly
115 120 125

60 TGC TAT ACA AAC AAT CCA CAC GTG CTT TTA CGA TAC GAT GTT TCC GGA 431
Cys Tyr Thr Asn Asn Pro His Val Leu Leu Arg Tyr Asp Val Ser Gly
130 135 140

65 CCT GAA GAT CAA TTT ATC TCG TTA GTA CTG TCT CAA CAC GAA AAA ACT 479
Pro Glu Asp Gln Phe Ile Ser Leu Val Leu Ser Gln His Glu Lys Thr
145 150 155

70 CAA GAT CTA TCA TAC ACT CTC TCT TGT TAC TGT ACC GAA CCC TTT ACA 527
Gln Asp Leu Ser Tyr Thr Leu Ser Cys Tyr Cys Thr Glu Pro Phe Thr

10

	160	165	170	175	
	CTA GGA AGA CCA CCA AA Leu Gly Arg Pro Pro 5 180				544
10	<210>2 <211>544 <212>DNA <213>Fragilariaopsis cylindrus				
	<400>2				
15	TCA AAC GAT GGT GCG CAA TAC GTA GTA GAG AAA TCG ATA CTG GTA GGT Ser Asn Asp Gly Ala Gln Tyr Val Val Glu Lys Ser Ile Leu Val Gly 1 5 10 15				48
20	TCA GTG AAT TAT CCT GTA AAA GAT CCA TTT AAT CAG ATG AAA CGT GGA Ser Val Asn Tyr Pro Val Lys Asp Pro Phe Asn Gln Met Lys Arg Gly 20 25 30				96
	TCA CTT CAA ACC TAC TCA GAT TCA TGG ACC GAA CGG GAT CGT ACC TCA Ser Leu Gln Thr Tyr Ser Asp Ser Trp Thr Glu Arg Asp Arg Thr Ser 35 40 45				144
25	TTT GTC ATG GCA TCA CGT AAC TTA GCC GAT TTT CGT AAT AAC GTG AAG Phe Val Met Ala Ser Arg Asn Leu Ala Asp Phe Arg Asn Asn Val Lys 50 55 60				192
30	GTA ACG ATC GAT GCT GTT TTT AAT CCA CTT TTT ATC AAC GAG GAA TAC Val Thr Ile Asp Ala Val Phe Asn Pro Leu Phe Ile Asn Glu Glu Tyr 65 70 75 80				240
35	AAA TGG ATC TTT CGT CAA GAA GGC TGG AGG TTA GAG ACA CCT GAC AAT Lys Trp Ile Phe Arg Gln Glu Gly Trp Arg Leu Glu Thr Pro Asp Asn 85 90 95				288
40	GTC AAC CTA CTT ATC AAT GGG AAC GCT TAT GTA AAC GCT AAG GCC GAC Val Asn Leu Leu Ile Asn Gly Asn Ala Tyr Val Asn Ala Lys Ala Asp 100 105 110				336
	CAG ATG GAC CCC CAA GAG GTT ATG ATA AAG CAA ATC TAC AGC AAT CTC Gln Met Asp Pro Gln Glu Val Met Ile Lys Gln Ile Tyr Ser Asn Leu 115 120 125				384
45	TTT GCT GAT CAC GTG TAT AGC AAA AGT CCA AAA GGA GAC GCC GCC CAA Phe Ala Asp His Val Tyr Ser Lys Ser Pro Lys Gly Asp Ala Ala Gln 130 135 140				432
50	GTA GTC ACC ATG ACA TTG GCA CCA AGG GCG AAT TCT GCA GAT ATC CAT Val Val Thr Met Thr Leu Ala Pro Arg Ala Asn Ser Ala Asp Ile His 145 150 155 160				480
55	CAC ACT GGC GGC CGT CTC GAG CAT GCA TCT AGA GGG CCC AAT TCG CCC His Thr Gly Gly Arg Leu Glu His Ala Ser Arg Gly Pro Asn Ser Pro 165 170 175				528
60	TAT AGT GAG TCG TAT T Tyr Ser Glu Ser Tyr 180 181				544

Patentansprüche

1. Für proteinspaltende Enzyme in Form von speziellen Proteasen kodierende
5 Nukleinsäuresequenzen,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Nukleinsäuresequenzen aus der kälteangepassten marinen Diatomee
Fragilaropsis cylindrus stammen und für eine Calpain-7-Protease gemäß
SEQ ID No.1 und für eine Zink-Metalloprotease gemäß SEQ ID No.2 oder für
funktionelle Varianten beider Proteasen kodieren oder als Abschnitte mit
10 mindestens 8 Nukleotiden davon ausgebildet sind.
2. Nukleinsäuresequenzen nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
15 die Nukleinsäuresequenzen als DNA oder RNA, vorzugsweise als
doppelsträngige DNA ausgebildet sind.
3. Nukleinsäuresequenzen nach Anspruch 1 oder 2
dadurch gekennzeichnet, dass
20 die Nukleinsäuresequenzen in Vektoren, vorzugsweise in Expressionsvektoren
enthalten sind.
4. Verwendung der Nukleinsäuresequenzen nach Anspruch 3 zur Expression
oder Überexpression der Enzyme Calpain-7-Protease und/oder Zink-
25 Metalloprotease in Wirtsorganismen.
5. Zu den Nukleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 1 oder 2 gehörige
Polypeptide, die aus mit den Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No.1 und
SEQ ID No.2 kodierten Aminosäuresequenzen, als funktionelle Varianten
30 davon oder als Abschnitte mit mindestens 6 Aminosäuren davon bestehen.

6. Verwendung der Enzyme Calpain-7-Protease und Zink-Metalloprotease nach Anspruch 1 zu Therapiezwecken

7. Verwendung der Enzyme Calpain-7-Protease und Zink-Metalloprotease 5 nach Anspruch 1 zu Reinigungszwecken bei proteinhaltigen Verschmutzungen.

8. Verwendung der Polypeptide nach Anspruch 5 zu Therapiezwecken.

9. Verwendung der Polypeptide nach Anspruch 5 zu Reinigungszwecken bei 10 proteinhaltigen Verschmutzungen.

1/2

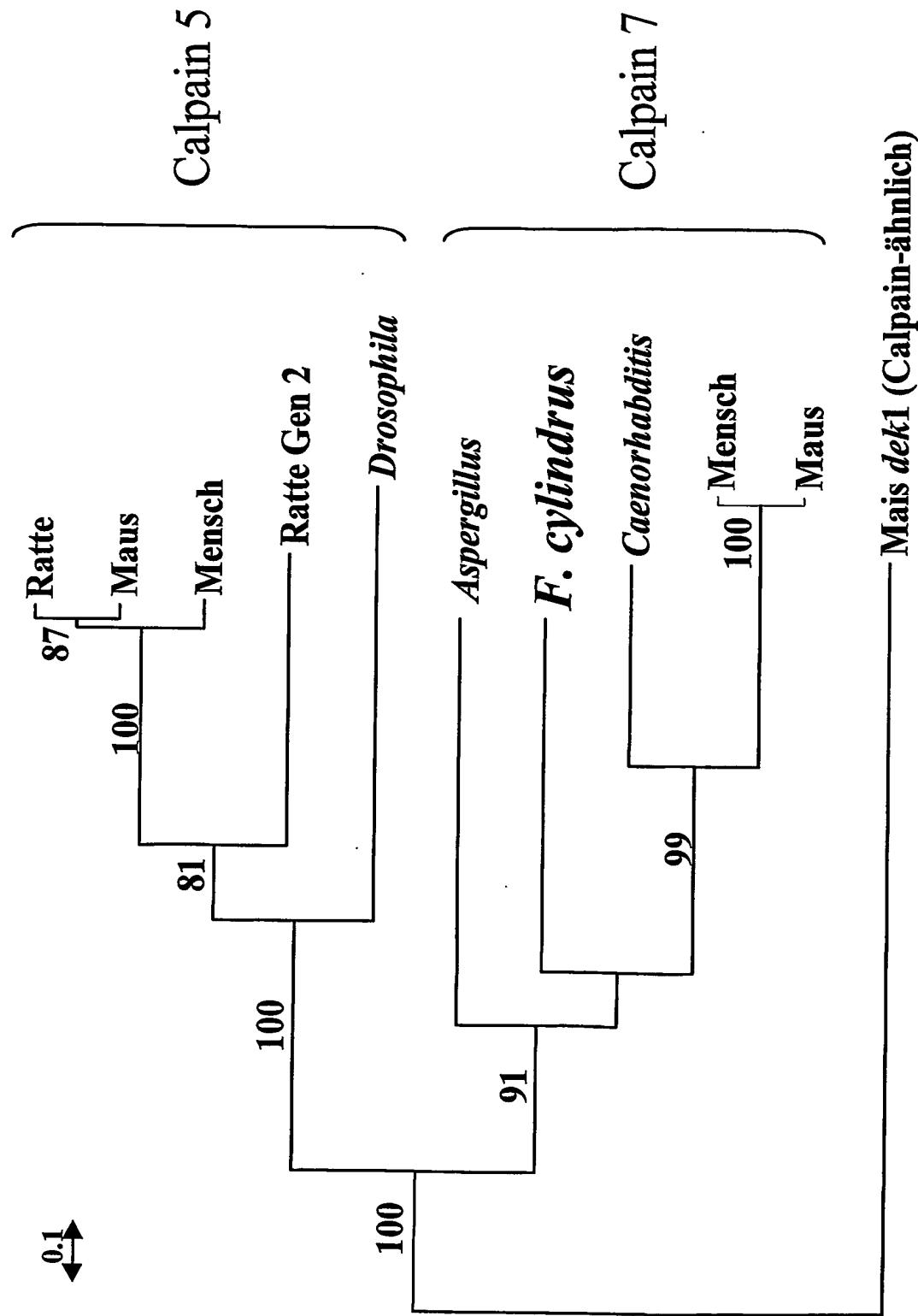
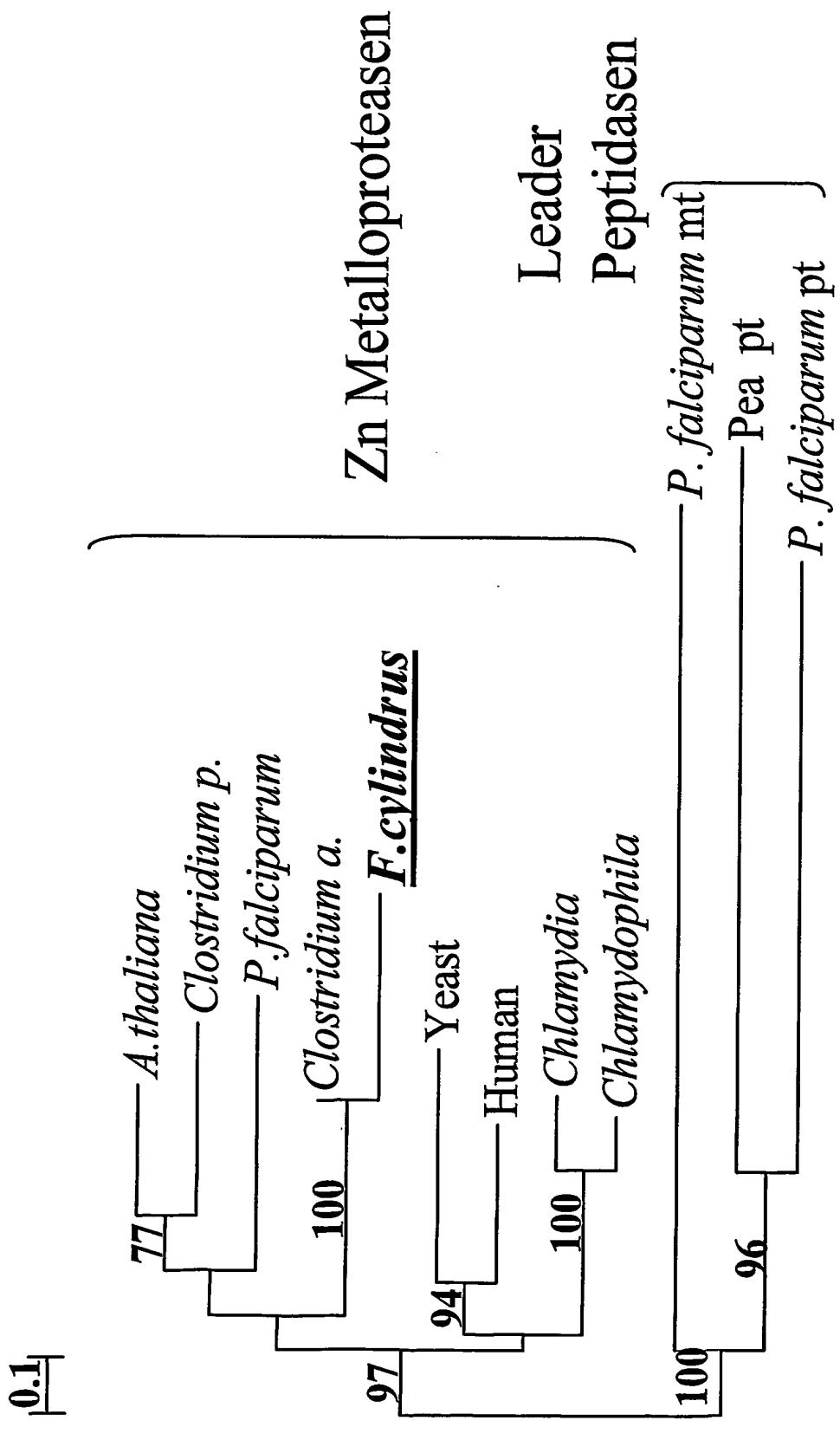


Fig.1

Mais dek1 (Calpain-ähnlich)

2/2



Zusammenfassung

Für **proteinspaltende Enzyme in Form von spezifischen Proteasen kodierende Nukleinsäuresequenzen, zugehörige Polypeptide und Verwendung von allen.**

Enzyme aus der spezifischen Gruppe der Calpain-Proteasen sind an vielen Stoffwechselvorgängen beteiligt, z.B. durch Einflussnahme auf die Apoptose, bei bestimmten Krebserkrankungen und bei der Zell-Migration. Enzyme aus der

Gruppe der Metalloproteasen entwickeln z.B. Aktivitäten bei der Befruchtung, sind als ACE bei der Blutdruckregulierung und als Collagenasen beim Collagen-Stoffwechsel beteiligt. Ein etwaiger Bedarf an solchen Enzymen muss heute hauptsächlich aus pflanzlichen und tierischen Quellen gedeckt werden.

Bekannte Organismen, in denen solche Proteasen natürlicherweise vorkommen, stammen ausschließlich aus wärmeren Regionen, sodass bei ihrer Produktion eine ökonomisch und apparatechnisch aufwändige Wärmezufuhr erforderlich ist. Bekannt sind jedoch auch Organismen, die kälteangepasste Enzyme aufweisen. Die Erfindung beansprucht daher für eine Calpain-7-Protease und eine Zink-Metalloprotease kodierende Nukleinsäuresequenzen,

die aus der kälteangepassten marinen Diatomee *Fragilaropsis cylindrus* stammen und gemäß SEQ ID No.1, SEQ ID No.2 oder als funktionelle Varianten oder als Abschnitte mit mindestens 8 Nukleotiden davon ausgebildet sind.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.